

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



⑬ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 52 854 A 1**

⑤ Int. Cl.⁶:
C 12 N 15/79
C 12 N 15/86
A 61 K 48/00

⑲ Aktenzeichen: 197 52 854.6
⑳ Anmeldetag: 28. 11. 97
㉑ Offenlegungstag: 1. 7. 99

DE 197 52 854 A 1

⑦ Anmelder:
Bundesrepublik Deutschland, letztvertreten durch
den Präsidenten des Paul-Ehrlich-Instituts Prof. Dr.
R. Kurth, 63225 Langen, DE

⑧ Vertreter:
Dr. Volker Vossius, Corinna Vossius, Tilman
Vossius, Dr. Holger Adam, Dr. Martin Grund, 81679
München

⑦ Erfinder:
Cichutek, Klaus, Dr., 60598 Frankfurt, DE;
Engelstädter, Martin, 63110 Rodgau, DE

⑥ Entgegenhaltungen:
WO 95 23 846 A1
WO 94 12 626 A1
CA 126:43290g (Abstract zu: Chu, T.-H.T. et al., J.
Virol. 71, 1997, 720-5);
CA 122:257341r (Abstract zu: Chu, T.-H.T. et al.,
J. Virol. 69, 1995, 2659-63);
CA 121:225351g (Abstract zu: Chu, T.-H.T. et al.,
Gene Ther. 5, 1994, 292-9);

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤ Zellspezifische retrovirale Vektoren mit Antikörperdomänen und Verfahren zu ihrer Herstellung für den
selektiven Gentransfer

⑤ Die Erfindung betrifft zellspezifische retrovirale Vektoren mit Antikörpererkennungsdomänen (scFv), die für die zellspezifische Transduktion eines ausgewählten Säugerzelltyps geeignet sind (Zelltargeting), Verfahren zur Herstellung der zellspezifischen retroviralen Vektoren und ihre Verwendung zur Genübertragung in ausgewählte Zellen. Die Erfindung betrifft ferner retrovirale Verpackungszellen zur Gewinnung der erfindungsgemäßen zellspezifischen retroviralen Vektoren.

DE 197 52 854 A 1

Die Erfindung betrifft zellspezifische retrovirale Vektoren mit Antikörpererkennungsdomänen (scFv), die für die zellspezifische Transduktion eines ausgewählten Säugerzelltyps geeignet sind (Zelltargeting), Verfahren zur Herstellung der zellspezifischen retroviralen Vektoren und ihre Verwendung zur Genußertragung in ausgewählte Zellen. Die Erfindung betrifft ferner retrovirale Verpackungszellen zur Gewinnung der erfindungsgemäßen zellspezifischen retroviralen Vektoren.

Die Mehrheit der retroviralen Vektoren, die in der gentherapeutischen Forschung zur Zeit benutzt werden, stammen vom amphotropen Maus-Mekämik-Virus (MLV) ab. Der Wirtszellbereich des amphotropen MLV wird durch das Oberflächen-Hüllprotein (SU) bestimmt, das vom env-Gen codiert wird. Die Proteinprodukte des env-Gens bilden die äußere Hülle des retroviralen Vektors. Die SU-Proteine interagieren mit, d. h. sie binden an ein bestimmtes Protein (Rezeptor) auf der Oberfläche der Wirtszelle. Die env-Genprodukte des amphotropen MLV erlauben den Gentransfer in eine große Anzahl unterschiedlicher Säugerzellen. Ein selektiver Gentransfer in bestimmte Zell- oder Gewebetypen des Menschen oder anderer Säuger ist mit amphotropen MLV-Vektoren aber nicht möglich, weil der Rezeptor für die MLV-Hüllproteine auf der Oberfläche der Säugerzellen, welches den Eintritt von amphotropen MLV-Vektoren und den Gentransfer vermittelt, auf fast allen diesen Zellen zu finden ist. Der Wirtszellbereich des amphotropen MLV ist daher nicht spezifisch.

Eine Wirtszellspezifität ist z. B. für den gentherapeutischen Einsatz jedoch von Vorteil, da bei einer Gentherapie außerhalb des Organismus (ex vivo) (Anderson et al., Science 256 (1992), 808-813; Yu et al., H. Gene Therapy 8 (1997), 1065-1072) aufwendige Aufreinigungen von Zellen vermieden werden. Für den Therapie-, Diagnostik- oder Impf-Einsatz in vivo ist erwünscht, daß die retroviralen Vektoren gezielt die gewünschten Wirtszellen ansteuern und anschließend das therapeutische Gen übertragen. Eine Einengung des Wirtszellbereichs des amphotropen MLV konnte durch Modifikation des Oberflächenhüllproteins erreicht werden. Eine Modifikation des Oberflächenhüllproteins wurde durch die Fusion mit einer Hormondomäne durchgeführt. Es fand eine Transduktion der Zellen statt, die den spezifischen Hormonrezeptor trugen (Kasahara et al., Science 266 (1994), 1373-1375). Ferner wurde das Oberflächenhüllprotein durch Fusion mit einem einkettigen Antikörperfragment (single chain variable fragment, nachfolgend auch "scFv" bezeichnet) modifiziert. Das Fragment repräsentierte die antigenbindende Domäne eines Antikörpers und ist ein Fusionsprotein, das aus den variablen Domänen Vh und Vl eines monoklonalen Antikörpers zusammengesetzt ist. Die beiden Domänen sind über ein Glycin- und Serin-Oligopeptid [- (ser-gly43-gly-)] verknüpft, das die korrekte Faltung des Fusionsproteins ermöglicht (Huston et al., Methods Enzymol. 203 (1991), 46-88; Whitlow et al., Methods: A companion to Methods Enzymol. 2 (1991), 97-105). Alle bisher durchgeführten Modifikationen des MLV-Oberflächenhüllproteins mit einem scFv zeigten, daß es zwar zu einer Bindung der Vektoren an die Wirtszelle kam, nicht jedoch zu einem Eintritt in die Zelle (Russel et al., Nucleic Acid Res. 21 (1993), 1081-1085). Weiterhin ist bekannt, daß das Oberflächenhüllprotein des MLV generell keine umfangreichen Modifikationen erlaubt (Cosset et al., J. Virol 69 (1995), 6314-6322). Modifikationen, bei denen ein Teil der Bindungsdomäne des MLV-SU-Proteins ersetzt wurde, führten oft zu einer inkorrekten Prozessierung und somit zu einem defekten Transport des SU-Proteins an die Zelloberfläche (Weiss et al., In J.A. Levy (ed.), The Retroviridae 2 (1993), 1-108; Morgan et al., J. Virol. 67 (1993), 4712-4721; Russel et al., Nucleic Acid Res. 21 (1993), 1081-1085). Die Entwicklung zellspezifischer retroviraler Vektoren auf Basis des MLV mit veränderten Oberflächenhüllproteinen ist daher wenig erfolgversprechend.

Retrovirale Vektoren auf Basis des Milznekrosevirus SNV ("Spleen Necrosis Virus") sind für einen gezielten Gentransfer in z. B. humane Zellen geeigneter, da das Oberflächen-Hüllprotein des SNV umfangreiche Modifikationen erlaubt und auch dann noch korrekt prozessiert wird (Martinez und Dornburg, Virol. 208 (1995), 234-241; Chu et al., Gene Therapy 1 (1994), 292-299; Chu und Dornburg, J. Virol. 69 (1995), 2659-2663). Zur Herstellung derartiger Vektoren benötigt man mindestens zwei Komponenten. Zum einen ist ein sog. Expressionskonstrukt herzustellen, das eine Verpackung in und den Transfer durch einen Retrovirus erlaubt. Das Expressionskonstrukt umfaßt ein kodierendes DNA-Fragment des gewünschten Genprodukts, z. B. ein Gen für die Gentherapie oder als Impfstoff. Das Expressionskonstrukt muß eine Nukleotidsequenz umfassen, die als Verpackungssignal psi (ψ) bezeichnet wird und die effiziente Verpackung der mRNA in retrovirale Partikel steuert. Ferner benötigt man eine Verpackungs- oder Helfierzelle, welche die gag-, Pol- und env-Genprodukte des SNV bereitstellt, ohne daß die gag-, Pol- und env-Gene in ein Retrovirus verpackt werden können. Die in der Verpackungszelle befindlichen gag-, pol- und env-Gene müssen psi-negativ sein. Nach Überführung des Expressionskonstruktes durch Transfektion der entsprechenden Plasmid-DNA in die Verpackungszellen werden retrovirale Partikel in den Zellkulturüberstand abgegeben, die das Expressionskonstrukt enthalten und nur dieses, nicht jedoch die gag-, Pol-, und env-Gene in die Zielzelle überführen können. Diese Vektoren sind vermehrungsunfähig und durchlaufen lediglich eine Replikationsrunde. Das allgemeine Verfahren zur Herstellung von vermehrungsunfähigen retroviralen Vektoren ist Stand der Technik (Weiss et al., In J. A. Levy (ed.), The Retroviridae 2 (1993), 1-108; Morgan et al., J. Virol. 67 (1993), 4712-4721; Russel et al., Nucleic Acid Res. 21 (1993), 1081-1085; Cosset et al., J. Virol 69 (1995); Martinez und Dornburg, Virol. 208 (1995), 234-241; Chu et al., Gene Therapy 1 (1994), 292-299; Chu und Dornburg, J. Virol. 69 (1995), 2659-2663).

Auch der Tropismus (Wirtszellspezifität) des Milznekrosevirus wird durch das Oberflächenhüllprotein (SU-Protein) bestimmt, das vom env-Gen des SNV codiert wird. Das Wildtyp-SNV-Oberflächenhüllprotein läßt keinen selektiven Gentransfer in bestimmte Zellen oder Gewebe des Menschen zu, da das spezifische Empfängerprotein (Rezeptor) nicht auf der Oberfläche von humanen Zellen vorhanden ist (Dornburg, Gene Therapy 2 (1995), 1-10). Deshalb wurde ein Verfahren entwickelt, um das SU-Protein des SNV gegen die antigenerkennende Domänen von Antikörpern zu ersetzen. Diese [SNV-scFV-Env]-Vektoren mit den zwei bisher bekannten unterschiedlichen scFv waren in der Lage, das psi-positive Reportergen, die bakterielle β -Galaktosidase, in die ausgewählte humanen Zielzellen zu übertragen. Diese scFv sind gegen das Hapten Dinitrophenol (DNP) bzw. gegen ein unbekanntes Oberflächenmolekül auf Colon-CA-Zellen und anderen Krebszellen gerichtet. (Chu et al., Gene Therapy 1 (1994), 292-299; Chu et al., BioTechniques 18 (1995), 890-899; Chu und Dornburg, J. Virol. 71 (1997), 720-725). Es wurde eine Verpackungszelllinie (DSH-CXL) entwickelt,

die sowohl die psi-negativen SNV-Gene gag, pol und env als auch das psi-positive Reportergen-Expressionskonstrukt (pCXL) enthält. Nach Transfektion der Verpackungszelle mit der Plasmid-DNA eines weiteren env-Expressionsgens (pTCS3), bei dem das gesamte Oberflächen-Hüllprotein gegen ein einkettiges Antikörperfragment (scFv) ersetzt wurde, wurden retrovirale Vektoren in den Zellüberstand abgegeben, die auf ihrer Oberfläche neben dem Wildtyp-Oberflächenhüllprotein auch das chimäre [scFv-Env]-Oberflächenprotein trugen. Mit Hilfe dieser Vektoren konnte das Reportergen in die für die scFv-spezifischen Zielzellen, Ilundeosteosarkomzellen (D17) die mit DNP konjugiert waren, bzw. HeLa-Zellen (humane Cervixkarzinomzellen) transferiert werden. Bei diesem beschriebenen Verfahren zur Herstellung zellspezifischer retroviraler Vektoren ist jedoch von Nachteil, daß nur bereits bekannte und klonierte scFv verwendet werden können. Ferner wurde von uns festgestellt, daß nicht jedes scFv als Teil eines [SNV-scFv-Env]-Vektors für die Zelltransduktion (Übertragen des gewünschten Gens auf die Zielzelle) geeignet ist.

Der Gentransfer in Säugerzellen mittels Retroviren hat generell folgende Vorteile:

- Es wird in der Regel eine Kopie des gewünschten Gens in die Säugerzelle überführt.
- Das gewünschte Gen wird im allgemeinen ohne Mutation oder Rearrangements übertragen.
- Es erfolgt ein stabiler Einbau des gewünschten Gens in das Genom der Zielzelle.

Weiterhin ist erwünscht, daß der retrovirale Vektor eine bestimmte Zellspezifität besitzt, durch die das z. B. therapeutische Gen in eine ausgewählte Zellpopulation eingeführt werden kann.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, zellspezifische retrovirale Vektoren mit Antikörpererkennungsdomänen für den selektiven Gentransfer in Säugerzellen sowie ein universelles Verfahren zu ihren Herstellung bereitzustellen. Mit Hilfe dieser Vektoren gelingt es, den Gentransfer zu verbessern. Der Erfindung liegt ferner die Aufgabe zugrunde, retrovirale Verpackungszellen zur Gewinnung der erfindungsgemäßen Vektoren bereitzustellen. Die Lösung dieser Aufgaben ergibt sich aus den Patentansprüchen, der nachfolgenden Beschreibung und den Figuren.

Die Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung zellspezifischer retroviraler Vektoren gelöst, umfassend die folgenden Schritte: a) Immunisieren eines Säugetiers mit einer oder mehreren Zellpopulation(en), b) Isolieren von RNA aus dem immunisierten Säugetier, umfassend die B-Zell-RNA, c) Herstellen von cDNA-Abschnitten der variablen Regionen der schweren und leichten Kette der Immunglobuline aus der isolierten RNA mittels RT-PCR mit Primern für die schwere und leichte Kette der Immunglobuline, wobei die Primer die Nukleinsäuresequenz für einen Oligopeptidlinker umfassen, d) Ligieren der cDNA-Abschnitte zu scFv-cDNAs, e) Ligieren der scFv-cDNAs in einen Phagemid-Vektor und Transformieren eines Wirtsbakteriums mit dem Phagemid-Vektor, f) Isolieren von Phagen, die an die in Schritt a) verwendete(n) Zellpopulation(en) binden, durch Selektion, g) Isolieren von zellspezifischen Phagen aus den in Schritt f) erhaltenen Phagen, die nur an die in Schritt a) verwendete(n) Zellpopulation(en) binden, durch Selektion, h) Ausschneiden der scFv-codierenden DNA-Fragmente aus den in Schritt g) erhaltenen zellspezifischen Phagen und Ligieren in einen psinegativen retroviralen Env-Expressionsvektor, i) Transformieren des erhaltenen Env-scFv-Expressionsvektors in eine Verpackungszelle, und j) Isolieren der von der Verpackungszelle sezernierten retroviralen Vektoren.

Gegebenenfalls umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren weiter die Vereinzelung der in Schritt g) erhaltenen zellspezifischen Phagen. Gegebenenfalls umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren weiter den Schritt: k) Isolieren der von der Verpackungszelle sezernierten retroviralen Vektoren, die die Zellen der Zellpopulation(en) transduzieren durch Selektion. Ferner können die Schritte f) und/oder g) mindestens einmal wiederholt werden.

Bevorzugt ist ein Verfahren, wobei das immunisierte Säugetier ausgewählt ist aus der Gruppe Maus, Ratte, Meeresschweinchen, Kaninchen, Ziege oder Schaf. Bevorzugt ist ebenfalls ein Verfahren, bei dem die Zellpopulation(en) ausgewählt ist aus der Gruppe Mensch, Maus, Ratte, Schaf, Rind oder Schwein. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem die Zellpopulation(en) ausgewählt ist (sind) aus der Gruppe T-Zellen, Epithelzellen, Muskelzellen, Stammzellen, neurale Zellen, hämatopoietische Zellen, Karzinomzellen oder Leberzellen. Bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem das env-Gen vom Milznekrosevirus (SNV) stammt. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem der Expressionsvektor der Vektor mit der Bezeichnung pTCS3 ist.

Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen zellspezifischen retroviralen Vektoren können als Arzneimittel verwendet werden. Bevorzugt ist die Verwendung zur Herstellung eines Arzneimittels zur Genterapie, Impfterapie oder Diagnostik. Besonders bevorzugt ist die Therapie der Cystischen Fibrose, des ADA-Mangels, von HIV-Infektionen, Leukämie, chronischer Granulomatose.

Die Erfindung wird ferner gelöst durch die Bereitstellung von retroviralen Verpackungszellen zur Gewinnung der erfindungsgemäßen retroviralen Vektoren, transformiert sowohl mit einem oder mehreren psi-negativen Expressionskonstrukt(en), die die gag-, Pol- und/oder env-Genprodukte exprimieren, als auch mit einem psi-negativen Env-scFv-Expressionskonstrukt nach Anspruch 1 h). Bevorzugt ist eine Verpackungszeile, ferner umfassend ein psi-positives Expressionskonstrukt, umfassend ein Nukleinsäurefragment, das in die durch den retroviralen Vektor zu transduzierende Zelle eingeführt werden soll. Besonders bevorzugt ist eine Verpackungszelle, wobei das Nukleinsäurefragment ein therapeutisches Gen oder dessen DNA-Fragment und/oder ein Reportergen umfaßt. Insbesondere bevorzugt ist eine Verpackungszelle, wobei das therapeutische Gen oder dessen Nukleinsäurefragment das CFTR-, phox91-, ADA-, IL-16-, p53- oder revM10-Gen oder Impfgene z. B. rekombinantes gp120 und IL-16 umfaßt. Ferner insbesondere bevorzugt ist eine Verpackungszelle, wobei das Reportergen β -Galaktosidase, "Green Fluorescent Protein", Luciferase oder Neomycin umfaßt.

Die Abbildungen dienen der Erläuterung der Erfindung

Abb. 1 zeigt schematisch die Env-scFv Expressionskonstrukt pTCS3, pT-scFv und pT/zeo, deren Transfektion in die Verpackungszelle DSH-CXL, die die erfindungsgemäßen Vektoren sezerniert.

Abb. 2 zeigt schematisch die Herstellung, Isolierung und Selektion der erfindungsgemäßen Vektoren.

Abb. 3 ist eine schematische Darstellung eines Immunglobulins und das daraus resultierende scFv. Dargestellt sind

weiterhin schematisch scFv-Display-Phagen und SNV-scFv-Env-Vektoren

Abb. 4 zeigt die Nukleinsäuresequenz von pTC53.

Der hier verwendete Begriff amphotropes Virus bedeutet Infektion und Replikation auf murinen und humanen Zellen, im Gegensatz zu ecotropen Viren, das nur auf murinen Zellen repliziert. Der hier verwendete Begriff retroviraler Vektor bedeutet replikationsdefizientes retrovirales Viruspartikel, das anstelle der retroviralen mRNA eine fremde eingeführte RNA eines Gens, z. B. eines therapeutischen Gens oder dessen Fragment oder eines Reportergens übertragen kann. Der hier verwendete Begriff Antikörpererkennungsdomäne (scFv) bedeutet Antigenbindestelle eines Antikörpers, umfassend V_H- und V_L-Kette. Der hier verwendete Begriff SNV bedeutet Milznekrosevirus mit seinen Stämmen und Substämmen. SNV gehört zu den Reticulo Endotheliose Viren (REV) der Vögel, Typ D-Retrovirus.

Für die Bereitstellung der zellspezifischen Antikörpererkennungsdomänen (scFv) wird eine neue kombinatorische Phagen-cDNA-Bibliothek der variablen Domänen der leichten und schweren Ketten der Immunglobuline hergestellt. Dazu wird ein Säugetier, z. B. eine Maus, Ratte, ein Kaninchen, Meerschweinchen, Ziege oder Schafe mit einem ausreichenden Titer einer oder mehrerer Zellpopulation(en) in üblicher Weise immunisiert. Die Zellpopulation ist die Zellart, die einen Oberflächenrezeptor ausbildet, an den die erfindungsgemäßen retroviralen Vektoren spezifisch binden. Die Zellen können von einem von dem zu immunisierenden Säugetier verschiedenen Säugetier stammen, z. B. vom Menschen, der Maus, Ratte, dem Schaf, Rind oder Schwein. Die Zellen können solche Zellen sein, in der z. B. eine somatische Gentherapie, eine Impfung oder Diagnostik durchgeführt werden soll. Typische Beispiele solcher Zellen sind T-Zellen, Leberzellen, Muskelzellen, neurale Zellen, Fibroblasten, Epithelzellen, Stammzellen oder hämatopoietische Zellen. Für die Immunisierung kann eine Zellpopulation oder mehrere Zellpopulationen gleichzeitig dem Säugetier verabreicht werden, je nachdem für welche Zellpopulation(en) der erfindungsgemäße retrovirale Vektor spezifisch sein soll.

Für die Herstellung der cDNA-Bibliothek wird zuerst die B-Zell-RNA des immunisierten Säugetiers in bekannter Weise isoliert. Die mRNA-Sequenzen der für die Antigenerkennung verantwortlichen Regionen der schweren und leichten Kette (V_H und V_L) der Immunglobuline werden mittels reverser Transkription und anschließender Polymerase-Kettenamplifikation in üblicher Weise in cDNA umgeschrieben und vervielfältigt. Die Primerpaare und deren Sequenzen für die V_H- und V_L-Regionen sind dem Fachmann bekannt. Sie sind z. B. im kommerziell erhältlichen Kit der Fa. Pharmacia enthalten, bzw. können den bekannten Datenbanken (EMBL) entnommen werden. Dem Fachmann ist bekannt, daß er für jede immunisierte Säugetierart verschiedene Primersequenzen verwenden muß. Die Sequenzen sind ebenfalls in den bekannten Datenbanken enthalten. Die cDNA-Fragmente der V_H- und V_L-Regionen werden dann mittels einer Ligase-Reaktion in üblicher Weise zu scFv-cDNAs verknüpft. Für den Fachmann ist ersichtlich, daß bei der Ligation unterschiedliche Kombinationen von cDNA-Fragmenten hergestellt werden. Die erhaltenen scFv-cDNAs können dann in einen Phagemid-Vektor z. B. pCAN1A 5E Phagemid, Fa. Pharmacia kloniert werden. Anschließend werden Wirtsbakterien z. B. E.coli TG1 mit dem Phagemid-Vektor transformiert.

Die von den Bakterien produzierten rekombinanten Phagen werden dann in üblicher Weise isoliert und auf das Vorhandensein von zellspezifischen scFv-Peptiden selektioniert. Die Phagen werden mit der Zellpopulation oder den Zellpopulationen in üblicher Weise in Kontakt gebracht, die für die Immunisierung verwendet worden sind. Die Phagen, die nicht an die Zellen binden, tragen kein spezifisches scFv-Peptid und werden durch Waschschriffe in üblicher Weise entfernt. Die Phagen, die an die Zellen binden, präsentieren das gewünschte scFv-Peptid auf ihrer Oberfläche und werden in üblicher Weise eluiert. Die Phagen, die das gewünschte scFv-Peptid präsentieren, werden vermehrt, indem man sie wieder in üblicher Weise die Wirtsbakterien infizieren läßt. Dieser Selektionsschritt kann ein oder mehrere Male wiederholt werden, um die bindenden Phagen anzureichern. Dieser Vorgang wird als "panning" bezeichnet. Die Phagen werden nach dem panning oder direkt nach dem ersten Selektionsschritt einer weiteren Selektion unterzogen. Dabei werden die Phagen mit einer oder mehreren anderen Zellpopulationen in Kontakt gebracht, die sich von den zur Immunisierung verwendeten Zellen unterscheiden. Die Phagen, die nicht an diese Zellen binden, präsentieren ein zellspezifisches scFv-Peptid. Sie werden in üblicher Weise aus dem Zellüberstand isoliert und für eine Wirtsbakterieninfektion zur Vermehrung verwendet. Auch dieser Selektionsschritt kann ein oder mehrere Male wiederholt werden (Marks et al., Biotechnologie 10 (1992), 779; Clackson et al., Nature 352 (1991), 624; Marks et al., J. Mol. Biol. 222 (1991), 581; Chaudhary et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 1066; Chiswell et al., TIBTECH 10 (1992), 80; McCafferty et al., Nature 348 (1990), 552; Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 5879).

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen zellspezifischen retroviralen Vektoren dient die vorstehend beschriebene Phagen-cDNA-Bibliothek als Ausgangsmaterial. Die scFv-cDNAs der Phagen, die nach dem zweiten Selektionsschritt und den gegebenenfalls durchgeführten panning-Verfahren übriggeblieben sind, werden in üblicher Weise aus der Phagen-DNA ausgeschnitten und in ein retrovirales Env-Expressionsgen inseriert. Das retrovirale env-Expressionsgen kann vom SNV stammen. Ein typisches Beispiel für ein SNV-scFv-env-Expressionskonstrukt ist pTC53. Die Sequenz ist in **Abb. 4B** gezeigt. Ein typisches Beispiel für ein Wildtyp(wt)-SNV-env-Expressionskonstrukt ist pIM29.

Die Konstruktion der für die wt-SNV-ENV-Proteine z. B. pIM29 und die chimären SNV-scFv-ENV-Proteine kodierenden Expressionplasmide ist von Chu et al. (J. Virol. 71 (1997), 720-725) vorbeschrieben. Die Expression der für das wt-env-Gen kodierenden DNA wird von einem MLV-Promotor gesteuert. Die env-cDNA wurde über die Restriktionsschnittstellen SacII und AvrII aus einem für das komplette SNV-Virus kodierenden Plasmid ausgeschnitten und durch Insertion in einen Linker (L) eingefügt. Um eine korrekte Prozessierung des Proteins zu gewährleisten, enthält pIM29 die Polyadenylierungsstelle des Simianen Virus 40 (SV40). Von diesem Plasmid kann somit die Expression des wt-env-Gens erfolgen, so daß nach proteolytischer Spaltung eines Vorläuferproteins das äußere Glykoprotein (SU) und das Transmembranprotein (TM) vorliegt. Es können jedoch andere, dem Fachmann bekannte Plasmide, Promotoren, Linker, Polyadenylierungssignale und weitere für eine korrekte Prozessierung benötigte DNA-Elemente verwendet werden.

Zur Expressierung von SNV-scFv-ENV-Proteinen werden die in bekannter Weise erhaltenen scFv in ein SNV-ENV-Expressionskonstrukt z. B. pTC53 in üblicher Weise eingeführt. Die in pTC53 vorhandenen Restriktionserkennungsstellen für die Enzyme SfiI und NotI ermöglichen die molekulare Klonierung von z. B. scFv zwischen SNV-env-Leader-Sequenz und dem für das Transmembranprotein (TM-Protein) kodierenden Bereich der DNA. Die im wt-ENV vorhandene Proteaseschnittstelle zwischen SU und TM ist in pTC53 deletiert, so daß ein Fusionsprotein exprimiert wird, das N-ter-

minal aus dem einkettigen Antikörperfragment und C-terminal aus dem SNV-TM besteht. Die regulatorischen Elemente wie MLV-Promotor und SV40-Polyadenylierungssignal sind identisch mit denen des pIM29-Vektors. Zur Verstärkung der Expression eines chimären env-Gens wird in dem Expressionsplasmid pTC53 eine adenovirale Leader-Sequenz z. B. AVtl (Sheay et al. BioTechniques, 15 (1993), 856-861) inseriert. Eine Zeocin-Kassette (pSV2zeo; Fa. Invitrogen, Niederlande) dient der möglichen Selektionierung von stabil transfizierten Zellen, so daß einzelne Zellklone etabliert werden können.

Das psi-negative SNV-scFv-env-Expressionskonstrukt kann mittels Elektroporation oder anderer bekannter Verfahren in üblicher Weise in Verpackungszellen eingeführt werden. Eine typische Verpackungszelle ist z. B. DSH-CXL. Die Verpackungszellen haben ferner psi-negative env, gag, pol-Expressionskonstrukte und für den gewünschten Gentransfer in die spezifischen Zielzellen ein weiteres psi-positives Expressionskonstrukt, das z. B. ein Gen oder DNA-Fragment für die Gentherapie, Impftherapie oder ein Reportergen für die Diagnostik umfaßt. Nach Transfektion der Verpackungszellen kommt es zu einer transienten Expression und Abgabe der retroviralen Vektoren, die neben natürlichen SU-Proteinen rekombinante SU-scFv-Proteine präsentieren, in den Zellkulturüberstand. Die retroviralen Vektoren können dann in üblicher Weise zur Transduktion der Zielzelle, d. h. der Zellpopulation, die zur Immunisierung verwendet wurde, eingesetzt werden. Gegebenenfalls kann dieser Schritt ein weiterer Selektionsschritt sein. Nur die erfindungsgemäßen retroviralen Vektoren, die die Zielzelle in ausreichender Weise transduzieren, werden weiter verwendet. Diese Vektoren können einem weiteren Selektionsschritt unterzogen werden. Die Vektoren können in üblicher Weise zur Transduktion von anderen Zellpopulationen als der Zellpopulation, mit der das Säugetier immunisiert wurde, eingesetzt werden. Die Vektoren, die nicht die anderen Zellen transduzieren, sondern nur die Zielzellen, können also in einem doppelten Selektionsschritt erhalten werden.

Für die Etablierung von stabilen Verpackungszelllinien, welche die erfindungsgemäßen retroviralen Vektoren konstitutiv abgeben, kann ein Selektionsmarker, z. B. das Zeocin-Resistenzgen (Fa. Invitrogen), in üblicher Weise in das scFv-Expressionskonstrukt z. B. pTC53 inseriert werden. Die mit dem Zeocin-Resistenz-Gen versehenen scFv-Expressionskonstrukte werden mittels z. B. der Liposomen-Technik (Lipofectamin, Gibco BRL) in die Verpackungszellen transferiert. Nach einer ca. zwei-wöchigen Selektion der Transfektanten in Zeocin-haltigem Kulturmedium können Zellklone etabliert werden, die je nach scFv-cDNA-Fragment Zielzellpopulationen mit einem Titer von etwa 10^4 - 10^6 retroviralen Vektoren pro ml transduzierten.

Das mit den erfindungsgemäßen retroviralen Vektoren in die Zielzellpopulation oder -populationen transduzierte Gen kann z. B. die RNA eines therapeutischen Gens oder dessen Fragment sein. Therapeutische Gene können iB. das CFTR-Gen, das ADA-Gen, der LDL-Rezeptor, β -Globin, Faktor VIII oder Faktor IX, das Dystrophin-Gen sein. Im Falle des CFTR-Gens wären die Zielzellen z. B. die Lungenepithelzellen, beim ADA-Gen die Stammzellen des Knochenmarks oder T-Lymphocyten, beim LDL-Rezeptor die Leberzellen, beim Dystrophin-Gen die Skelettmuskelzellen, beim β -Globin-Gen die hämopoietischen Stammzellen, beim Faktor VIII oder Faktor IX die Fibroblasten und Leberzellen. Dem Fachmann ist ersichtlich, daß diese Aufzählung nur eine Auswahl der therapeutischen Gene darstellt und andere Gen ebenfalls für eine Gentherapie verwendet werden können. Die DNA-Fragmente eines therapeutischen Gens umfassen z. B. Antisense-Nukleinsäuren oder Ribozyme. DNA-Fragmente können ferner Bereiche eines Gens umfassen, die die Trinukleotidwiederholungen von z. B. des Fragile X Gens enthalten.

Ferner kann die RNA eines Reportergens, z. B. β -Galaktosidase, GFP, Luciferase oder Neomycin in die erfindungsgemäßen retroviralen Vektoren eingeführt werden. Die Reportergene ermöglichen, festzustellen, ob die Zielzellen mit den retroviralen Vektoren transduziert worden sind.

Ferner kann die RNA eines Gens oder dessen Fragment zu Impfwirkstoffen in die Zielzelle transduziert werden. Ein typisches "Impfgen" ist z. B. das rekombinante gp120 oder gp160 von HIV. Die Transduzierung von Immunzellen mit diesen Genen oder Fragmenten regt zu einer Antikörperbildung gegen die viralen Genprodukte an.

Die erfindungsgemäßen Vektoren können z. B. durch i.v.- oder i.m.-Injektionen appliziert werden. Es können jedoch auch die erfindungsgemäßen Verpackungszellen in z. B. Organoide (Teflonbeutel) eingeschlossen werden, die dann in den Organismus eingepflanzt werden und in die Blutbahn oder ins Gewebe die erfindungsgemäßen Vektoren sezernieren. Weitere Applikationsformen sind für den Fachmann offensichtlich.

Die erfindungsgemäße retrovirale Verpackungszelle zur Gewinnung der erfindungsgemäßen pseudotypisierten retroviralen Vektoren wird bereitgestellt, indem eine Zelllinie, z. B. eine humane Zelllinie mit den psi-negativen Expressionskonstrukten, die die gag- und pol-Genprodukte des SNV exprimieren, und mit dem psi-negativen SNV-Env-Expressionskonstrukt und/oder Psi-negativen SNV-scFv-env-Expressionskonstrukt, in üblicher Weise transfiziert wird.

Ferner können Verpackungszellen verwendet werden, die bereits die psi-negativen Expressionskonstrukte für die gag und pol-Genprodukte enthalten. In solche Verpackungszellen müssen dann nur das psi-negative Expressionskonstrukt für die Virushülle und das psi-positive Expressionskonstrukt für die in die Zielzelle zu transduzierende Nukleinsäuresequenz transfiziert werden. Dem Fachmann sind die Verfahren zur Transfektion der Expressionskonstrukte bekannt. Von den erfindungsgemäßen Verpackungszellen werden retrovirale Vektorpartikel in den Zellüberstand abgegeben, die das Expressionskonstrukt enthalten nicht jedoch die Konstrukte, die für die GAG-, POL- und ENV-Proteine kodieren. In die Zielzelle wird somit nur das gewünschte z. B. therapeutische Gen oder Reportergen überführt.

Die dargestellte Erfindung eröffnet die folgenden Möglichkeiten:

- Gene, Gen-Fragmente oder sonstige Nukleinsäuresequenzen können in ausgewählte Säugerzellen überführt werden,
- weitere Effizienzsteigerungen des Nukleinsäuretransfers durch Verbesserung der env-Genkonstrukte können erreicht werden,
- Gentherapie-, Markierungs- und Impfstrategien können entwickelt werden, für die ein selektiver Nukleinsäuretransfer in ausgewählte Säugerzellen wünschenswert ist.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht als einschränkend aufzufassen:

1. Isolierung und Klonierung zellspezifischer scFv

Zur Herstellung, Isolierung und Selektion von zellspezifischen scFv wurde eine Maus mit der humanen T-Zelllinie T-
C8166 (Clapham et al., Virology 158 (1987), 44–51) in üblicher Weise immunisiert, die Milz entfernt und die RNA iso-
liert. Die Klonierung der scFv-cDNAs wurde mit dem kommerziell erhältlichen Kit der Fa. Pharmacia nach Angaben des
Herstellers durchgeführt.

Die erhaltenen Phagen wurden in üblicher Weise auf ihre Bindungseigenschaften gegenüber den Zielzellen untersucht.
Es wurden 150 Phagen isoliert, die spezifisch an die Zielzellen banden. Die 150 so erhaltenen zellspezifischen scFv wur-
den verwendet, um die erfindungsgemäßen SNV-scFv-Vektoren herzustellen.

2. Klonieren der spezifischen scFv-cDNA-Fragmente in Env-Expressionskonstrukte

Die scFv-cDNAs der 150 zellspezifischen scFv wurden in üblicher Weise aus der Phagemid-DNA ausgeschnitten und
jeweils in das Expressionskonstrukt pTC53 ligiert. pTC53 wurde erhalten durch Modifizierung des universellen eukaryo-
tischen Vektors pRD114 (Chu et al., J. Virol. 71 (1997), 720–725; Sheay et al. BioTechniques, 15 (1993), 856–861; Chu
et al., BioTechniques, 18 (1995), 890–895). In diesem Vektor wurde das SNV-wt-env-Gen bis auf die für die Leader-Se-
quenz und das Transmembran-Protein kodierende c-DNA deletiert. Ein zusätzlich eingeführter Spacer ermöglicht die In-
sertion einer Fremd-DNA (hier die scFv-cDNA) im Anschluß an die ENV-Leader-Sequenz über die Restriktionserken-
nungsstelle NaeI. Die Sequenz von pTC53 ist in Abb. 4 gezeigt. Für die Insertion der scFv-cDNA wurde das Env-Ex-
pressionskonstrukt pTC53 dahingehend modifiziert, daß Sfi I und Not I spezifische Restriktionsendonuklease-Erken-
nungsstellen in den Linker zwischen der SNV-Leader-Sequenz und der SNV-Transmembran-Sequenz (TM) in üblicher
Weise eingefügt werden. Hierzu wird eine rekombinante PCR ausgehend von der DNA des Plasmids PKA1558 (Scov H.
& Andersen K.B., 1993) und der für das anti Transferriorezeptor-scFv kodierenden DNA in üblicher Weise durchgeführt,
so daß über Nru I (5' und 3') eine Insertion des amplifizierten Fragments in das Nae I restringierte pTC53 möglich ist. Das
so inserierte Fragment enthält die multiple Sfi I/Not I Klonierungsstelle, da die verwendeten Primer neben der endstän-
digen Nru I Erkennungsstelle weiterhin eine benachbarte Sfi I bzw. Not I Erkennungsstelle beinhalten. Für die rekombi-
nante PCR wurden folgende Primer verwendet

PKATFNRRu+:

5'-GGGCCCTCGCGAGCGGGCCAGCCGGCCGACATCAAGATGACCCAGTCTCCA-3'

Nru I

Sfi I

PKATFNRRu-:

5'-GGGCCCTCGCGATCGGGCCGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCC-3'

Nru I

Not I

Die PCR-Bedingungen waren: 94°C/3 min, 94°C/1 min, 59°C/1 min, 72°C/1 min., 25 X Schleifen, 72°C/10 min und
dann bis 4°C abkühlen. Das PCR-Fragment wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus der Gelmatrix extrahiert
(Quiaex, Fa. Qiagen) und mit dem Nae I geöffneten Plasmid pTC53 in üblicher Weise ligiert.

Die scFv-cDNAs aus dem Phagemid (pCANTA 5E) wurden mittels der Restriktionsendonukleasen Sfi I und Not I aus-
geschnitten. Dazu wurde Phagemid-Plasmid-DNA mittels bekannter Verfahren hergestellt und jeweils 8 µg Plasmid-
DNA mit jeweils 60 U der Restriktionsendonukleasen Sfi I und Not I für 1,5 h bei 50°C und anschließend 1,5 h bei 37°C
verdaut. Der Reaktionsansatz fand in einem Volumen von 200 µl statt, der mit 20 µl BSA (10fach konz.) und 20 µl Re-
aktionspuffer 3 (10fach konz.) supplementiert wurde. Nach Beendigung der Reaktionszeit wurde der Ansatz in einem
1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde die scFv-cDNA spezifische Bande (ca.
750 bp) aus dem Agarosegel mittels bekannter Verfahren aufgereinigt.

Das aufgereinigte Fragment wurde mit dem ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen Sfi I und Not I geöffneten
Env-Expressionskonstrukt pTC53 ligiert. Dazu wurden äquimolare Mengen des scFv-cDNA-Fragments und pTC53-
Fragments in einem 15 µl Volumen mit 200 U T4-Ligase und 1,5 µl 10-fach Ligase-Puffer supplementiert. Der Ansatz
wurde bei 4°C über Nacht inkubiert. Um eine effiziente Transformation von Bakterien zu ermöglichen, wurden die Bak-
terienstämme 'TOP10F' und JS5 mit einer nach Hanahan (1983) modifizierten Methode kompetent gemacht. Nach dem
Animpfen von 100 ml LB-Medium mit 500 µl einer Übernachtskultur wurde die Bakteriensuspension bei 37°C bis zu ei-
ner Dichte (OD₅₅₀) von 0,6 inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf Eis gekühlt, bei 6.000 rpm und 4°C pelle-
tiert (Minifuge RF, Heraeus, Hanau) und in 40 ml TFB1-Puffer (30 mM KOAc, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 15% Gly-
cerin, pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt, danach steriltfiltriert) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten
auf Eis und einer Zentrifugation bei 6.000 rpm und 4°C wurde das Bakterienpellet in 4 ml TFB2-Puffer (10 mM MOPS,
75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15% Glycerin, pH 6,5 mit KOH-Lösung eingestellt, danach steriltfiltriert) resuspendiert.
Die Bakteriensuspension wurde dann in Aliquots je 100 µl aufgeteilt und auf Trockeneis schockgefroren. Die Lagerung
erfolgte bei -70°C. Zur Transformation wurden 100 µl der kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und nach Zugabe
von 1–2 µl des jeweiligen Ligationsansatzes für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem anschließenden Temperatur-
shock (45 s bei 42°C anschließend 2 min auf Eis) wurden die Bakterien mit 500 µl SOC-Medium (GIBCO/BRL, Eg-
genstein) versetzt und bei 37°C für eine Stunde zur Expression der Antibiotikaresistenz in einem Bakterien-schüttler kul-
tiviert. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Agarplatten, die mit dem Antibiotikum Ampicillin supplementiert waren,
ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Die Präparation von Plasmiden aus Bakterien (E.coli TopF10) erfolgte mit den QIAGEN-Plasmid-Kits der Firma QIAGEN, Hilden. Für die Präparation einer geringen Menge Plasmid-DNA wurden die Bakterien einer 15 ml-Übernachtskultur (LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin) mit den vom Hersteller gelieferten Lösungen lysiert und über eine Anionenaustauscher-Säule (tip-20) gereinigt. Zur Gewinnung großer Mengen Plasmid-DNA (Maxi-Präparation) wurden 400 ml Übernachtskulturen angesetzt.

3. Selektion der retroviralen Vektoren

Transiente Transfektion der scFv-pTC53-Expressionskonstrukte in die Verpackungszelle DSH-CXL mittels Elektroporation: Für die Elektroporation wurden jeweils 2×10^6 DSH-CXL Zellen in 480 µl PBS resuspendiert und in eine auf Eis gelagerten Gene-Pulser-Küvette (0,4 cm Elektrode, Lücke 50, Biorad, München) überführt. Danach wurden 20 µg der rekombinanten Plasmid-DNA der Zelllösung zugegeben. Der Inhalt der Küvette wurde einem elektrischen Puls in einem Elektroporator (Gene-Pulser Apparatus, Biorad, München) bei 270 V und 960 µF ausgesetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation der Küvette auf Eis wurden die Zellen in 20 ml frisches Kulturmedium in eine mittlere Zellkulturflasche (Nunc, Wiesbaden) überführt. Am nächsten Tag wurden die DSH-CXL-Zellen mit frischem Medium versetzt und kultiviert.

Der Virus-haltige Überstand der Transfektanden wurde zur Transduktion der Zielzellen eingesetzt. Am Tag vor der Transduktion wurden die C8166-Zielzellen im Verhältnis 1 : 2 in frisches Medium umgesetzt. Die Überstände wurden mit einem 0,45 µm Filter (Sartorius) steril filtriert. 7 ml des Überstandes wurden dann direkt zur Transduktion von 2×10^5 C8166-Zellen eingesetzt. Um die Anbindung der retroviralen Vektoren an die Zelloberfläche zu stabilisieren erfolgte eine Zugabe von 40 µg/ml Polybrene. Nach einer 2 stündigen Inkubation bei 37°C, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in frisches Kultur-Medium überführt.

Nachweis der β-Galaktosidase-Aktivität (X-Gal-Assay): Zur Überprüfung einer erfolgreichen Transduktion wurde nach 72 Stunden ein X-Gal-Assay nach der Methode von Sanes et al. (1986) modifiziert durchgeführt. Der Zellkulturüberstand wurde abgezogen und die Zellen mit PBS ohne (Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Fixierlösung (2% Formaldehyd, 0,2% Glutaraldehyd in PBS) für 5 min überschichtet und mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in 3 ml X-Gal-Reaktionsmischung (1 mg/ml, 5 mM K-Ferricyanid, 5 mM K-Ferrocyanid, 2 mM MgCl_2) resuspendiert. Nach einer ca. 4-stündigen Inkubation des Ansatzes bei 37°C trat die Blaufärbung der transduzierten Zellen auf.

Von den 150 getesteten scFv-pTC53-Expressionskonstrukten waren 6 zellspezifisch (M8, K6, 7A5, 7E10, 6C3, 7B4). Das heißt es konnten pro zellspezifischem Konstrukt 10–20 blau-gefärbte C8166-Zellen erkannt werden. Das ist im Vergleich zu nicht zellspezifischen scFv-Klonen signifikant. Von 6 zellspezifischen scFv-Expressionskonstrukten wurden stabile Verpackungszelllinien generiert.

4. Etablierung stabiler Verpackungszelllinien

Herstellung des Zeocin-Resistenzgens mittels PCR ausgehend von DNA des Plasmids pSCVZeo (Fa. Invitrogen): Um Verpackungszellen nach einer stabilen Transfektion mit dem pTC53zeoscFv-Plasmid auf eine stabile Expression des Resistenzgens zu selektionieren, wurde eine Zeocin-Kassette integriert. Hierzu wurde mittels rekombinanter PCR aus dem Vektor pZeoSV2 (+/-) der Firma Invitrogen (NV Leek, Niederlande) eine Zeocin-Kassette amplifiziert und mit den Restriktionsschnittstellen NdeI 5' und 3' versehen, so daß die Kassette anschließend in den NdeI restringierten Anteil des pUC19-Rückgrades des pTC53 inseriert werden konnte. Der PCR-Ansatz (100 µl) enthielt: 1×PCR-Puffer (Taq: 10 mM Tris/HCl, pH 8,8, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 , 0,01% Gelatine, 10 µM (+)- und 10 µM (-)-Primer, 200 µM je Desoxynukleotid, 2,5 Einheiten Taq-Polymerase und 100 ng Plasmid-DNA oder. Es wurden folgende Oligonukleotide verwendet.

ZEO2184+NDE:

5'-GGAAATTCCATATGGAATTCCTGTTACATAACTTACGGTAAATGGC-3'

Nde I

ZEO3258-NDE:

5'-GGAATTCCATATGGAATTCCTCAGTCCTGCTCCTCGGCC-3'

Nde I

Die PCR-Bedingungen waren: 94°C/3 min, [94°C/1 min, 60°C/1 min, 72°C/1,5 min.] 30 X Zyklen, 72°C/10 min und 4°C Endtemperatur.

Insertion eines Zeocin-Resistenz-Gen in die im transienten Test positiven scFv-pTC53-Env-Expressionskonstrukte. Transfektion mittels Lipofectamin™ (GIBCO/BRL, Life Technologies, Eggenstein).

Lipofectamin™: N-[2-((2,5bis-(3-aminopropyl)amino)-1-oxypentyl)amino]ethyl-N,N-dimethyl-2,3-bis (9-octadecenyl)-1-propanaminium tritluoroacetat)/Dioleoyl-phosphatidylethanolamin; 3 : 1 (w/w).

Am Vortag der Transfektion wurden 1×10^6 Zellen in eine 60 mm-Zellkulturschale (Greiner, Nürtingen) ausgesät. Für die Transfektion wurden 1-5 µg (je nach Versuchansatz) der rekombinanten Plasmid-DNA in 200 µl serumfreiem Medium resuspendiert. Parallel dazu wurden 8–25 µl (je nach Versuchansatz) Lipofectamin™ in 200 µl serumfreiem Me-

dium verdünnt. Nach dem Vereinigen beider Lösungen, folgte eine Inkubation für 45 min bei RT. Das DNA-Liposomen-Gemisch wurde auf 2 ml Endvolumen aufgefüllt und auf die mit serumfreiem Medium gewaschenen Zellen gegeben. Daraufhin wurden die Zellen für 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2 ml frisches Medium zugegeben, das die zweifache Konzentration an FCS enthielt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

- 5 Zur Etablierung stabiler Verpackungszellklone wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit einem Selektionsmedium überschichtet. Das Zeocin™ Resistenzgen (Streptoalloteichus hinductanus Bleomycin-Gen) wurde als Selektionsmarker benutzt. Die Selektion erfolgte in DMEM-Medium, supplementiert mit 525 µg/ml Zeocin™ (Phleomycin von Streptomyces verticillus; Invitrogen BV, Niederlande). Die Zellen wurden zweimal wöchentlich mit frischem Selektionsmedium versetzt. Nach ca. 4 Wochen konnten Zellfoci, die Zellklone darstellten, identifiziert werden. Diese Kolonien wurden einzeln abgenommen, in eine 24-Loch-Platte (Flachboden, Nunc, Wiesbaden) in Zellkulturmedium ohne Antibiotikumssupplement überführt. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Erlangten die Zellen eine Konfluenz von ca. 90%, wurden sie in entsprechend größere Zellkulturgefäße expandiert.

Patentansprüche

- 15 1. Verfahren zur Herstellung zellspezifischer retroviraler Vektoren, umfassend die folgenden Schritte:
- a) Immunisieren eines Säugetiers mit einer oder mehreren Zellpopulation(en),
 - b) Isolieren von RNA aus dem immunisierten Säugetier, umfassend die B-Zell-RNA,
 - c) Herstellen von cDNA-Abschnitte der variablen Regionen der schweren und leichten Kette der Immunglobuline aus der isolierten RNA mittels RT-PCR mit Primern für die schwere und leichte Kette der Immunglobuline, wobei die Primer die Nukleinsäuresequenz für einen Oligopeptidlinker umfassen,
 - d) Ligieren der cDNA-Abschnitte zu scFv-cDNAs,
 - e) Ligieren der scFv-cDNAs in einen Phagemid-Vektor und Transformieren eines Wirtsbakteriums mit dem Phagemid-Vektor,
 - f) Isolieren von Phagen, die an die in Schritt a) verwendete(n) Zellpopulation(en) binden, durch Selektion,
 - g) Isolieren von zellspezifischen Phagen aus den in Schritt f) erhaltenen Phagen, die nur an die in Schritt a) verwendete(n) Zellpopulation(en) binden, durch Selektion,
 - h) Ausschneiden der scFv-codierenden DNA-Fragmente aus den in Schritt g) erhaltenen zellspezifischen Phagen und Ligieren in einen psi-negativen retroviralen Env-Expressionsvektor,
 - i) Transformieren des erhaltenen Env-scFv-Expressionsvektors in eine Verpackungszelle, und
 - j) Isolieren der von der Verpackungszelle sezernierten retroviralen Vektoren.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die in Schritt g) erhaltenen zellspezifischen Phagen vereinzelt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Schritte f) und/oder g) mindestens einmal wiederholt werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, weiter umfassend den Schritt:
- k) Isolieren der von der Verpackungszelle sezernierten retroviralen Vektoren, die die Zellen der Zellpopulation(en) transduzieren durch Selektion.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Säugetier ausgewählt ist aus der Gruppe Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Ziege oder Schaf.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Zellpopulation(en) ausgewählt ist aus der Gruppe Mensch, Maus, Ratte, Schafe Rind oder Schwein.
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Zellpopulation(en) ausgewählt ist (sind) aus der Gruppe, umfassend T-Zellen, Epithelzellen, Muskelzellen, hämatopoietische Zellen, Stammzellen, neurale Zellen, Karzinomzellen oder Leberzellen.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das env-Gen des psi-negativen retroviralen Env-Expressionsvektors vom Milznekrosevirus (SNV) stammt.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei der Expressionsvektor der Vektor mit der Bezeichnung p1C53 ist.
10. Retrovirale Vektoren, erhältlich nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
11. Verwendung der retroviralen Vektoren nach Anspruch 10 als Arzneimittel.
12. Verwendung des Vektors nach Anspruch 10 zur Herstellung eines Arzneimittels zur somatischen Gentherapie, Impftherapie oder Diagnostik.
13. Verwendung des Vektors nach Anspruch 10 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie der Cystischen Fibrose, des ADA-Mangels, der chronischen Granulomatose oder der HIV-1 Infektion.
14. Retrovirale Verpackungszelle zur Gewinnung der retroviralen Vektoren nach Anspruch 10, transformiert sowohl mit einem oder mehreren psi-negativen Expressionskonstrukt(en), die die gag-, Pol- und/oder env-Genprodukte exprimieren, als auch mit einem psi-negativen Env-scFv-Expressionskonstrukt nach Anspruch 1 h).
15. Retrovirale Verpackungszelle nach Anspruch 14, ferner umfassend ein psi-positives Expressionskonstrukt, umfassend ein Nukleinsäurefragment, das in die durch den retroviralen Vektor zu transduzierende Zelle eingeführt werden soll.
16. Retrovirale Verpackungszelle nach Anspruch 15, wobei das Nukleinsäurefragment ein therapeutisches Gen oder dessen DNA-Fragment und/oder ein Reportergen oder ein Resistenzgen umfaßt.
17. Retrovirale Verpackungszelle nach Anspruch 16, wobei das therapeutische Gen oder dessen Nukleinsäurefragment das CFTR-, phox91-, ADA-, IL-16-, p53- oder revM10-Gen oder ein oder mehrere Impfgene z. B. rekombinantes gp120 und IL-16 umfaßt.
18. Retrovirale Verpackungszelle nach Anspruch 16, wobei das Reportergen β -Galaktosidase, "Green Fluorescent Protein", Luciferase und das Resistenzgen Neomycin umfaßt.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Transduktion von T-Zellen mit [SNV-scFv-Env]-Vektoren

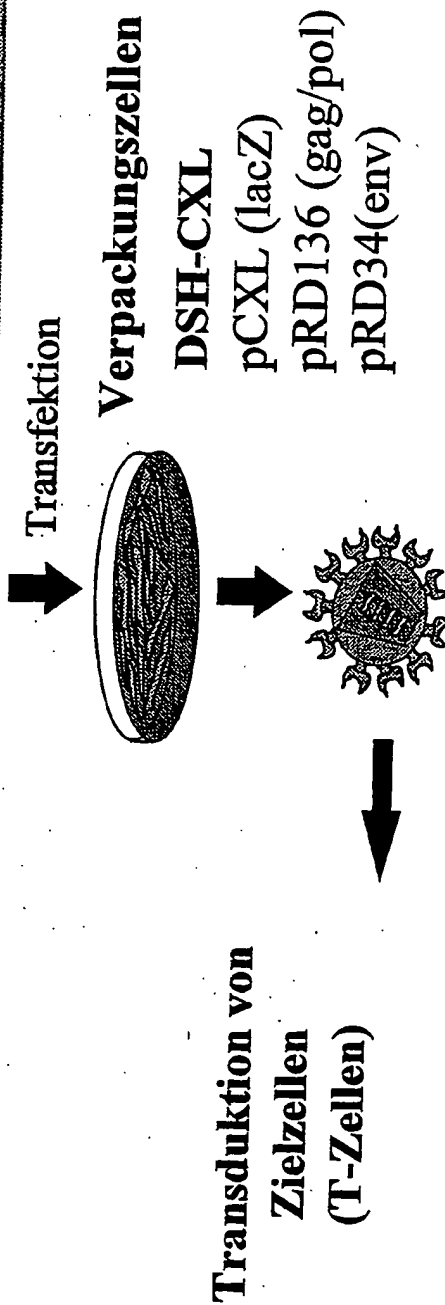
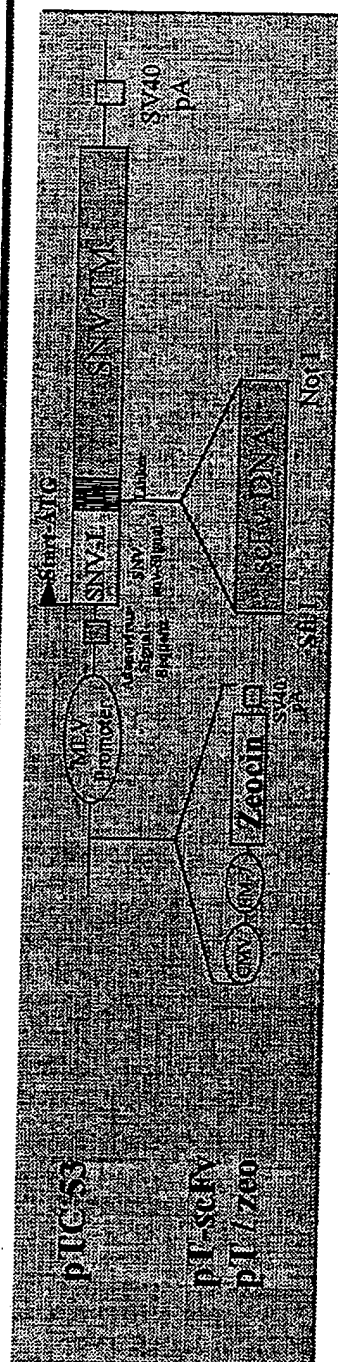


Abb. 1

Herstellen einer SNV-scFv-Env Vektor-Bibliothek

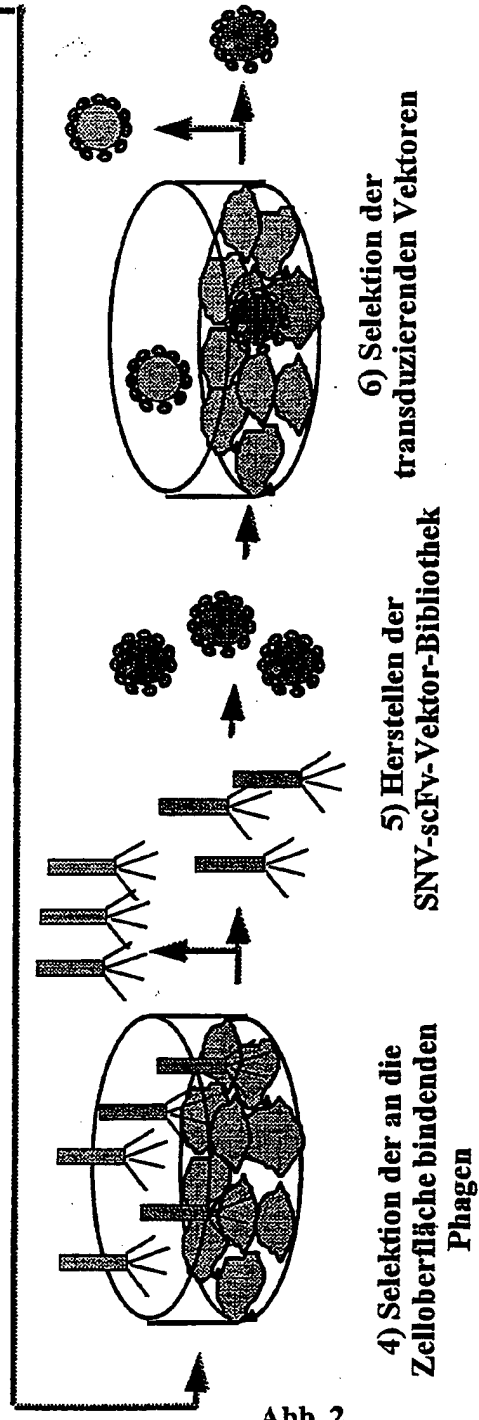
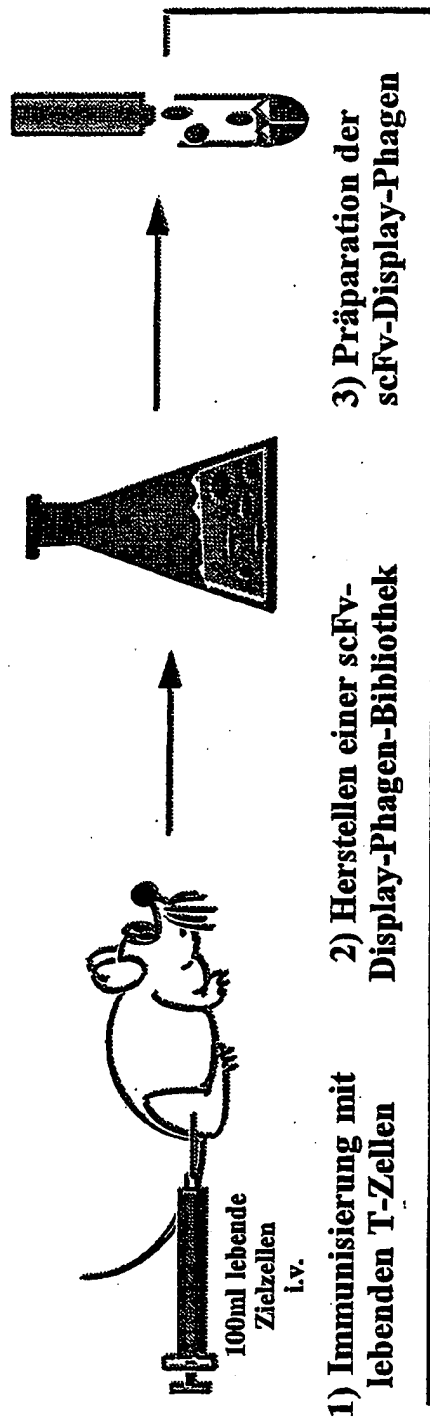


Abb. 2

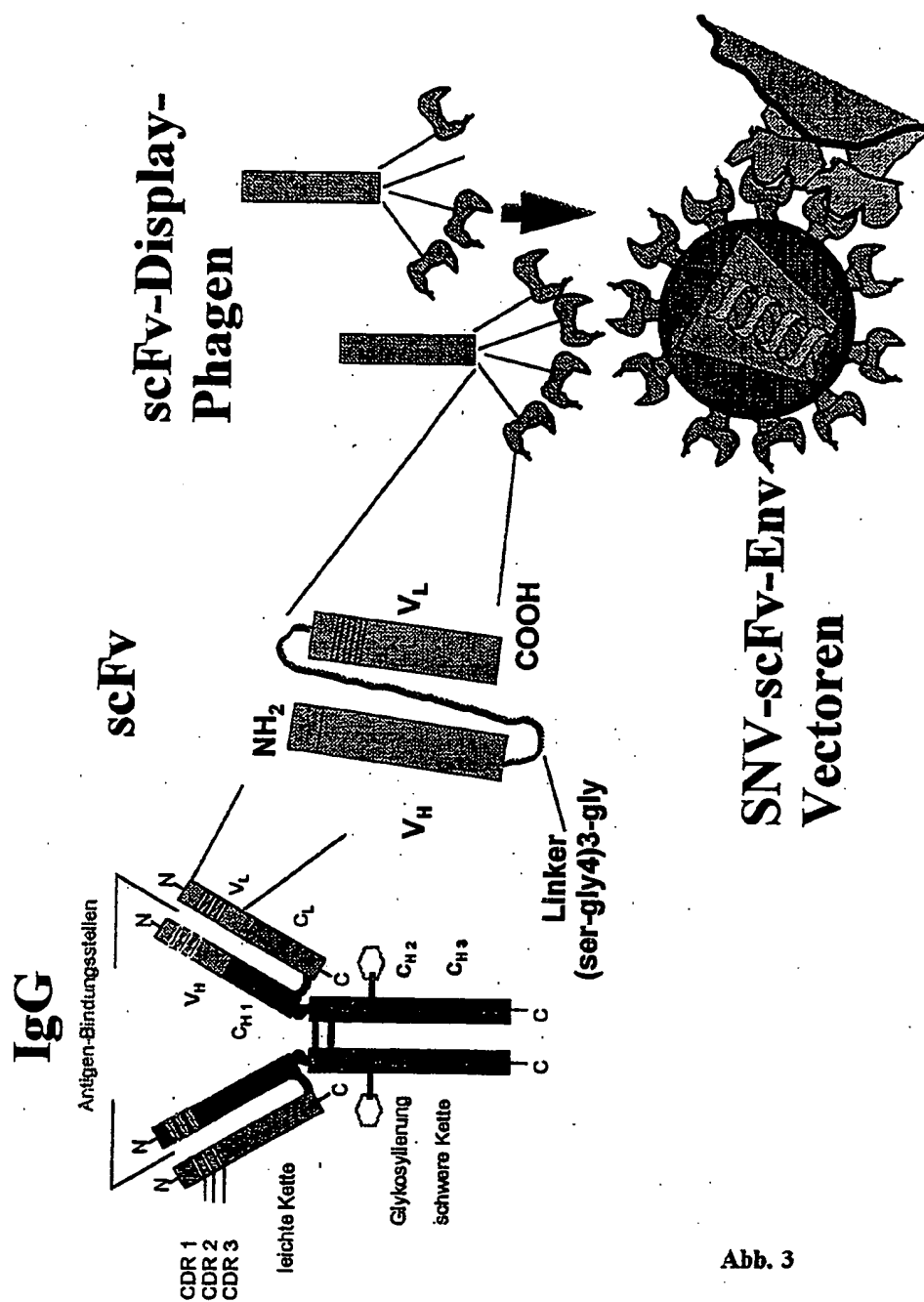


Abb. 3

[illegible]

Abb. 4B